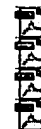


**CYCLOHEXANEDIOL CRYOPROTECTANT COMPOUNDS****Patent number:** JP2003530406T**Publication date:** 2003-10-14**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** A01N1/02; C12N1/04**- european:** A01N1/02**Application number:** JP20010575819T 20010417**Priority number(s):** US20000197669P 20000417; WO2001US12465  
20010417**Also published as:**

WO0178505 (A1)

EP1274302 (B1)

DE60104105T (T2)

DE60104105D (T2)

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2003530406T

Abstract of corresponding document: **WO0178505**

A method of cryopreserving cells includes bringing the cells into contact with a cryopreservation composition containing at least one cyclohexanediol compound, and subsequently reducing the temperature of the cells to a cryopreservation temperature. The at least one cyclohexanediol compound is preferably the cis or trans forms of 1,3-cyclohexanediol or 1,4-cyclohexanediol, and racemic mixtures thereof. A preferred cryopreservation composition includes the at least one cyclohexanediol compound and at least one additional cryoprotectant compound.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

pc9028 2/9

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-530406

(P2003-530406A)

(43) 公表日 平成15年10月14日 (2003. 10. 14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 0 1 N 1/02		A 0 1 N 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/04		C 1 2 N 1/04	4 H 0 1 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2001-575819(P2001-575819)  
 (86) (22) 出願日 平成13年4月17日 (2001. 4. 17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年10月17日 (2002. 10. 17)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 1 / 1 2 4 6 5  
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 7 8 5 0 5  
 (87) 国際公開日 平成13年10月25日 (2001. 10. 25)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 9 7 , 6 6 9  
 (32) 優先日 平成12年4月17日 (2000. 4. 17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 オーガン リカヴァリー システムス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 60018 ド  
 ウ プレインズ イー デヴォン アヴェ  
 ニュー 2570  
 (72) 発明者 ケルヴィン ジー エム ブロックバンク  
 アメリカ合衆国 サウスカロライナ州  
 29401 チャールストン ラトレッジ ア  
 ヴェニュー 81  
 (74) 代理人 弁理士 杉村 興作

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シクロヘキサネディオール凍結防止剤化合物

(57) 【要約】

【解決課題】 低温保存する際に効果的に細胞を保護し、かつ凍結状態から加温する際に細胞の活性を高めることを可能とする凍結防止物質を提供する。

【解決手段】 細胞を少なくとも一種のシクロヘキサネディオール化合物を含む低温保存組成物と接触させた後、細胞の温度を低温保存温度にまで下げることからなる、細胞を低温保存する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞を少なくとも一種のシクロヘキサンジオール化合物を含む低温保存組成物と接触させた後、細胞の温度を低温保存温度にまで下げることからなる、細胞を低温保存する方法。

【請求項2】前記少なくとも一つのシクロヘキサンジオール化合物が、1, 3-シクロヘキサンジオール及び1, 4-シクロヘキサンジオールのシス体あるいはトランス体及びそれらのラセミ体からなる群から選択される、請求項1の方法。

【請求項3】前記シクロヘキサンジオール化合物が0.05～2.0Mの量で低温保存組成物中に存在する、請求項1の方法。

【請求項4】前記低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の別の低温保存化合物を含有する、請求項1の方法。

【請求項5】前記少なくとも1種類の別の低温保存化合物が、アセタミド、アガロース、アルギナート、1-アナリン(aniline)、アルブミン、酢酸アンモニウム、ブタンジオール、硫酸コンドロイチン、クロルホルム、塩化デキストラン(dextrans)、ジエチレングリコール、ジメチルアセタミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド(DMSO)、エリスリトール、エタノール、エチレングリコール、ホルムアミド、グルコース、グリセロール、 $\alpha$ -グリセロホスフェート、グリセロール、モノアセテート、グリシン、ヒドロキシエチルスターチ、イノシトール、ラクトース、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、マルトース、マンニトール、マンノース、メタノール、メチルアセトアミド、メチルホルムアミド、メチルウレア、フェノール、ブルロニックポリオール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プロリン、プロピレングリコール、ピリジンN-オキシド、リボース、セリン、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、サッカロース、トレハロース、トリエチレングリコール、トリメチルアミンアセテート、尿素、バリン及びキシロースからなる群から選択される、請求項4の方法。

【請求項6】前記少なくとも一種の別の低温保存剤化合物が0.1～10.0の量で低温保存組成物中に存在する、請求項4の方法。

【請求項7】低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の不凍蛋白を含む、請求項1の方法。

【請求項8】前記不凍蛋白は低温保存組成物の0.01~1mg/mLの量で低温保存組成物中に存在する、請求項7の方法。

【請求項9】低温保存組成物はさらに少なくとも1種の不凍蛋白を含む、請求項4の方法。

【請求項10】冷凍保存温度が-20℃以下である、請求項1の方法。

【請求項11】少なくとも1種類のシクロヘキサンジオール化合物と少なくとも1種の別の低温保存化合物とからなる、低温保存組成物。

【請求項12】前記少なくとも1種類のシクロヘキサンジオール化合物は、1,3-シクロヘキサネジオール及び1,4-シクロヘキサンジオールのシス体あるいはトランス体及びそれらのラセミ体からなる群から選択される、請求項11の低温保存組成物。

【請求項13】前記シクロヘキサンジオール化合物が0.05~2.0Mの量で低温保存組成物中に存在する、請求項11の低温保存組成物。

【請求項14】前記少なくとも1種類の別の低温保存化合物が、アセタミド、アガロース、アルギナート、1-アナリン(aniline)、アルブミン、酢酸アンモニウム、ブタンジオール、硫酸コンドロイチン、クロルホルム、塩化デキストラン(s)、ジエチレングリコール、ジメチルアセタミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド(DMSO)、エリスリトール、エタノール、エチレングリコール、ホルムアミド、グルコース、グリセロール、 $\alpha$ -グリセロホスフェート、グリセロール、モノアセテート、グリシン、ヒドロキシエチルスターチ、イノシトール、ラクトース、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、マルトース、マンニトール、マンノース、メタノール、メチルアセトアミド、メチルホルムアミド、メチルウレア、フェノール、ブルロニックポリオール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プロリン、プロピレングリコール、ピリジンN-オキサイド、リボース、セリン、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、サッカロース、トレハロース、トリエチレングリコール、トリメチル

アミンアセテート、尿素、パリン及びキシロースからなる群から選択される、請求項11の低温保存組成物。

【請求項15】前記少なくとも一種の別の低温保存化合物が0.1～10.0の量で低温保存組成物中に存在する、請求項11の低温保存組成物。

【請求項16】低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の不凍蛋白を含む、請求項11の低温保存組成物。

【請求項17】前記不凍蛋白は低温保存組成物の0.01～1mg/mLの量で低温保存組成物中に存在する、請求項16の低温保存組成物。

【請求項18】低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の不凍糖蛋白を含む、請求項11の低温保存組成物。

【請求項19】前記不凍糖蛋白は低温保存組成物の0.01～1mg/mLの量で低温保存組成物中に存在する、請求項18の低温保存組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、商務省によって付与された付与番号協働合意番号70NANB7H3071により政府の支援の下になされた。政府は、本発明に所与の権利を有する。

## 【0002】

本発明は、特定のシクロヘキサンジオール分子及びそれらを凍結防止剤として使用する方法に関する。

## 従来の技術

## 【0003】

低温生物学は、生物システムに対する正常の生理的温度未満の温度の影響を研究する学問であると定義することができる。過去半世紀の間、低温生物学の科学の基礎的な事項は、低温を用いて虚血及び低酸素の生じている間に生物系を保護し保存する手段として現在広範囲に用いられる所まで発展してきた。実際、凍結を伴わない低体温を利用するか、あるいは水性系が氷を形成する物理的相変化を伴う低温保存を用いて保存を行なっている。適当な低温保存剤（CPA）を用いることによってのみ、低温保存工程での激しい凍結と解凍にもかかわらず細胞を生存させ、一般にこれらの技法を適用して、懸濁状態の細胞を分離したり、あるいは簡単な細胞内で細胞の小塊を分離することができる。さらに複雑な組織及び所定の構造を有する器官は、従来の低温保存法を用いる場合容易には保存できない。これは、主に組織化した多数細胞組織内での氷の形成により悪影響を受けるためである。単に細胞や組織を凍結するだけでは、素材は死んで機能しなくなる。

## 【0004】

現代の低温生物学は、実際 Polge et al.、"Revival of Spermatozoa After Vitrification and Dehydration at Low Temperatures," Nature, 164巻666頁（1949年）によって報告されたグリセロールの有する凍結防止性の発見に始まる。その後、Lovelock et al.

、 “P r e v e n t i o n o f F r e e z i n g D a m a g e t o L i v i n g C e l l s b y D i m e t h y l S u l f o x i d e” , N a t u r e、183巻1394頁(1959年)により、ジメチルスルホキサイドも凍結防止剤であることが発見された。現在広範な化合物が凍結防止性を示すとして知られているが、グリセロールが現在も依然最も広く使用されている。

【0005】

低温生物学の基本原則の概説は、B r o c k b a n k、 “P r i n c i p l e s o f C r y o p r e s e r v e d V e n o u s T r a n s p l a n t a t i o n、10章の “E s s e n t i a l o f C r y o b i o l o g y” (1995年)に見れる。凍結による損傷度は系中の遊離水の量及び凍結中に該水が結晶化する能力に依存するというのが低温生物学の基本原則である。多くのタイプの分離細胞及び細胞凝集小塊は、発表されている以下の方法に従うことによって簡単に得ることができるが、さらに複雑な組織について再現性のある結果を得る場合には組織の低温保存性に関与する主要な変数を理解することが必要となる。組織の凍結に関与する主要な変数には、(1)凍結相応性のpH緩衝剤、(2)凍結保存剤の選択、濃度、投与法、(3)冷却プロトコール、(4)貯蔵温度、(5)加温プロトコールおよび(6)凍結防止剤の流出が含まれる。

【0006】

多数の凍結防止剤が発見されている。例えば、上記のB r o c k b a n k参照。低温保存のために凍結防止材を選択する場合、通常種々の生物学系に不凍性を付与するものに限られる。場合により、凍結防止材を組み合わせることにより、細胞の生存を付加的にあるいは共乗的に延長する場合がある。化学薬品と凍結防止性とを比較しても共通の構造上の特徴は見出せない。これらの化学薬品は通常2つのクラスに分けられる。即ち、(1)細胞を透過する低分子量の細胞内凍結防止剤と(2)細胞を透過しない比較的高分子量(サッカロース(342ダルトン)以上)の細胞外凍結防止剤とである。濃度が0.5~3モルのグリセロール及びジメチルスルホキサイド等の細胞内凍結防止剤は、ゆっくり凍結させる多くの生物系での細胞の損傷を最小とする場合に有効である。ポリビニルピロリドンやヒドロキシエチルスターチ等の細胞外凍結防止剤は高速で冷却する生物系を保護

する場合に有効である。

【0007】

低温保存中に細胞の活性を高めるような改良凍結防止物質が依然として望まれている。

【0008】

〔課題を解決するための手段〕

従って、本発明の目的は、低温保存する際に効果的に細胞を保護し、かつ凍結状態から加温する際に細胞の活性を高めることを可能とする凍結防止物質を提供することにある。

【0009】

本発明のさらに別の目的は、細胞及び組織を低温保存する際に一貫しかつ再現性のある結果を得ることを可能とする凍結保存物質を提供することにある。

【0010】

さらに、本発明の別の目的は、自然界に生ずる不凍性蛋白質（AFP）に関連して作用して累積的に凍結後の細胞の生存率を上昇させることができる凍結防止物質を提供することを目的とする。

【0011】

本発明は新たに発見した凍結防止化合物を用いることに関するもので、これらの目的あるいは他の目的が達成する。特に、本発明は、生細胞を保存する際に凍結保存剤として、シクロヘキサンジオール化合物、さらに詳しく述べると1, 3-シクロヘキサンジオール（1, 3CHD）及び1, 4-シクロヘキサンジオール（1, 4CHD）のシス体あるいはトランス体及びそれらのラセミ混合物を用いることに関する。

【0012】

本発明では、低温保存する細胞を、少なくとも1種類のシクロヘキサンジオール化合物を含む低温保存組成物と接触させ、その後細胞の温度を低温保存温度にまで下げることによって、低温保存の影響から細胞を保護する。

【0013】

また、本発明では、低温保存組成物は少なくとも1種類のシクロヘキサンジオ



ール化合物のみならず、少なくとも1種類の別の凍結防止化合物及び／または少なくとも1種類の不凍性蛋白質を含むことが好ましい。

【 0 0 1 4 】

〔 発 明 の 実 施 の 形 態 〕

発明者らは、凍結防止活性を示す2つの新規な化合物：1，3-シクロヘキサンジオール（1，3CHD）と1，4-シクロヘキサンジオール（1，4CHD）を発見した。また、発明者は、これらの化合物が天然に存在する不凍性蛋白質（AFP）と連携して作用して累積態様で凍結後の生存を率を高めることが可能であることを発見した。

【 0 0 1 5 】

本発明においては従来のいずれの方法によっても低温保存、即ち凍結することによって細胞を保存することができる。本明細書で使用する「凍結」は、水の氷点以下、即ち0℃以下の温度を意味する。典型的には、低温保存は、凍結、例えば-130℃以下の温度に細胞を凍結して冷却することを含む。低温保存温度は-20℃未満、さらに好ましくは-80℃以下、最も好ましくは-130℃以下とすべきである。

【 0 0 1 6 】

本発明のCHD凍結防止化合物を用いて低温保存する細胞は、懸濁させてもよいし、基材に付着させてもよいし、その他制限はない。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法では、低温保存する間に保護する細胞をまず低温保存組成物と接触させる。低温保存組成物と接触させるとは、細胞を何らかの態様で低温保存組成物と接触させて、低温保存温度に温度を下げる際に、細胞を低温保存組成物によって保護することを意味する。例えば、細胞を細胞を付着させたプレートの適当なウェルを充填し、あるいは細胞を低温保存組成物中に懸濁させる等により細胞を低温保存組成物に接触させることができる。

【 0 0 1 8 】

また、好ましくは、低温保存する細胞は、最も典型的には少なくとも塩基性塩溶液からなる不凍結性のpH緩衝液、エネルギー源（例えば、グルコース）及び

冷却温度で中性 pH を維持することが可能な緩衝剤と接触させるべきである。これらの周知の物質には、例えば、ダルベッコ (Dulbecco) 変性イーグル培地 (Modified Eagle Medium (DMEM)) がある。この物質は、低温保存組成物の一部として含めることもできる。

【0019】

本発明の低温保存組成物は、少なくとも1種類のシクロヘキサンジオール (CHD) 化合物、例えば1, 3-シクロヘキサンジオールあるいは1, 4-シクロヘキサンジオールのシス体あるいはトランス体およびそれらのラセミ混合物を含まなければならない。好ましくは、CHD化合物は、例えば0.05-2.0M、さらに好ましくは0.1M-1.0Mの量で低温保存組成物中に存在する。

【0020】

また、低温保存組成物は、好ましくは組織保存用に良好に適合させた溶液を含む。該溶液中には、上記緩衝剤を含めることができる。特に好ましい溶液としては、例えば、デキストローゼ、リン酸カリウム一塩基及び二塩基、重炭酸ナトリウム及び塩化カリウムからなるユーロコリンズ溶液 (Eurocollins Solution) がある。

【0021】

本発明の別の実施例では、低温保存組成物はCHD化合物のみならず、少なくとも1種類の別の凍結防止化合物を含む。これらの別の凍結防止化合物としては、限定をするのではないが、アセタミド、アガロース、アルギナート、1-アナリン (aniline)、アルブミン、酢酸アンモニウム、ブタンジオール、硫酸コンドロイチン、クロルホルム、塩化デキストランズ (dextrans)、ジエチレングリコール、ジメチルアセタミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド (DMSO)、エリスリトール、エタノール、エチレングリコール、ホルムアミド、グルコース、グリセロール、 $\alpha$ -グリセロホスフェート、グリセロール、モノアセテート、グリシン、ヒドロキシエチルスターチ、イノシトール、ラクトース、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、マルトース、マンニトール、マンノース、メタノール、メチルアセトアミド、メチルホルムアミド、メチルウレア、フェノール、プルロニックポリオール、ポリエチレングリコール

、ポリビニルピロリドン、プロリン、プロピレングリコール、ピリジンN-オキサイド、リボース、セリン、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、サッカロース、トレハロース、トリエチレングリコール、トリメチルアミンアセテート、尿素、バリン及びキシロースを含む、上掲のBrockbankの表10.1に挙げる化合物のいずれのものも含む。この別の凍結防止化合物は、好ましくは、例えば0.1M-10.0M、好ましくは0.1-2.0Mの量で低温保存組成物中に存在する。

#### 【0022】

本発明のさらに別の実施態様では、低温保存組成物には、別の凍結防止化合物を含まないCHD化合物の場合、別の凍結防止化合物を含むCHD化合物を含む場合、また不凍性プロテイン/ペプチド(AFP)を含む場合もある。また、AFPは、不凍性糖蛋白質(AFGP)及び昆虫不凍性あるいは「熱性ヒステシス」蛋白質(THP)を含む。自然界に存在するAFPは、氷結晶を成長させるプリズム面に結合し、結晶形成を変化させることが可能であると考えられている。これらの蛋白質ができる魚類や昆虫では、このことはそれらの凍結点を下げることを意味し、これらの蛋白質は通常は魚類や昆虫の体液を凍結させるような状態下でも生存することが可能となる。

#### 【0023】

これとの関連で周知のAFPを本発明で使うことができる。例えば、8種類のこのような蛋白質を記載しているSicheri & Yang, Nature, 375巻427-431(1995年)参照。最も好ましくは、AFPはAFPI(AFP型I)、AFPIII(AFP型III)及び/又はAFGPとすることができる。

#### 【0024】

AFPは、例えば、低温保存組成物に、各AFPについて、例えば組成物当たり0.01~1mg/mL、好ましくは0.05~0.5mg/mLの量で存在する。

#### 【0025】

細胞は一旦低温保存組成物と接触すると、細胞は冷凍され冷凍保存状態となる。細胞の低温保存及びその後の加温はどのような方法によって行っても良いが、当該技術で周知のさらに別の物質を用いることもできる。以下の説明で好ましい実施態様を記載し、実施例を以下に上げる。

【 0 0 2 6 】

本発明において低温保存するための冷却（冷凍）プロトコールは、いずれかの適切な形とすることができる。冷却プロトコールの多くの形は当業者には周知である。最も典型的には、冷却プロトコールは氷核化点から $-80^{\circ}\text{C}$ まで継続的に所定の速度で冷却することを要求するが、冷却速度は当該技術で理解されるように冷凍する細胞／組織の特性による（再度上記 B r o c k b a n k 参照）。冷却速度は、例えば1分間当たり $-0.1^{\circ}\text{C}$ から $-10^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは1分間当たり $-1^{\circ}\text{C}$ ～ $-2^{\circ}\text{C}$ とすることができる。一度細胞をこのように連続的速度で約 $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却して、さらに低温保存温度まで冷却するために細胞を液体窒素あるいは液体窒素の気相中に移す。低温保存温度は、冷凍溶液のガラス転移温度以下である（再度、典型的には $-130^{\circ}\text{C}$ 以下）。

【 0 0 2 7 】

一旦冷凍保存した後、細胞を再度暖めて冷凍保存状態から冷凍保存していた細胞を取出す。冷凍状態から細胞を取出すための加温プロトコールは、当業者に周知のいずれの加温プロトコールとすることができる。典型的には、完全に再度加温が行われるまで、冷凍保存中の試料を水浴中（温度は約 $37\sim 42^{\circ}\text{C}$ ）に入れる、1段階工程で加温を行う。さらに迅速に加温することも知られている。

【 0 0 2 8 】

最も好ましくは、低温保存した細胞、特に基体に固定して低温保存した細胞については、ここに参照してすべての内容を取込む「低温保存した試料の新規な加温方法」という発明の名称の共に継続中の2001年4月17日出願の米国特許出願 No. 60 / 197, 670 に記載した方法によって加温する。これらの方法は、ヒートシンクを使用する場合や使用しない場合を含み、2工程の加温プロトコールを含む。

【 0 0 2 9 】

本発明の低温保存組成物は少なくとも一つのCHD化合物を含み、累積態様で凍結によって低温細胞の生存率を上昇させることができることは驚くべきことである。以下の実施例は、凍結防止剤としてのCHD化合物の驚くべき有用性を説明している。

【0030】

(実施例)

実施例1

AV5と呼ぶ最初の細胞株をこれらの実験で用いた。AV5細胞は、豚の心臓弁片から得た。心臓は複数の豚から得て、心臓弁片を取出し、殺菌性燐酸塩緩衝食塩水(PBS)によって数度洗浄した。小片( $\sim 1\text{ mm}^2$ )を切り出し0.2%のゼラチンで被覆した24個のウエル付マイクロ滴定プレートに入れた。10%致死子牛血清(FCS)を含むダルベッコ変性イーグル培地を加えてウエルの底部をまさに覆って、視覚によって成長が確認できるまで、滴定プレートを空气中で5%CO<sub>2</sub>の濃度で37℃に放置した。

【0031】

細胞がウエルを満たすまで成長を継続させ、その後細胞をトリプシンを用いてウエルから取出して、小型の細胞培養フラスコに入れた。フラスコが細胞融合に達したら、細胞を再度トリプシンによって取出し、 $-135^{\circ}\text{C}$ で10%のジメチルスルホキシド(DMSO)中に保存した。

【0032】

CHD化合物の凍結防止能力を評価するために、図1のプロトコールに沿って行った。AV5細胞を各実験の前の日に25、000細胞/ウエルに置いた。各実験の始めに、滴定プレートを氷の上において、種々の低温保存組成物を投与する前に細胞をマンニトールに曝した。

【0033】

すべての低温保存組成物は、デキストローゼ、一塩基及び二塩基燐酸カリウム、重炭酸ナトリウム及び塩酸カリウムからなり、ユールコリンズ溶液内で調整した。そして、滴定プレートを $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で $-80^{\circ}\text{C}$ に冷却し、さらに液体窒素の蒸気で冷却し $-135^{\circ}\text{C}$ で一晩貯蔵した。

## 【0034】

次の日に、滴定プレートを取り出し、 $-4^{\circ}\text{C}$ に加温し、この温度で氷の上に置いた。加温時に、細胞培地に $0.5\text{ M}$ マンニトール $150\text{ }\mu\text{l}$ を入れ、該培地を細胞に加えた。一度氷に置いたのち、凍結防止剤／マンニトール混合物を除去した。細胞を $0.5\text{ M}$ マンニトール／培地で2度洗浄し、 $\text{DMEM}$  ( $10\text{ FCS}$ ) で2度洗浄した。

## 【0035】

その後、非侵入代謝指示剤アラマー (Alamar) ブルー (トレック ダイアグノスティックス Trek Diagnostics) を用いて細胞の活性を決定した。アラマーブルーは、細胞内の酸化／還元反応を測定する蛍光性染料であり、したがって凍結防止剤に曝した後の細胞の全体的な活性を指示する。アラマーブルー $20\text{ }\mu\text{l}$ 容積を $200\text{ }\mu\text{l}$ の $\text{DMEM}$  ( $10\text{ \% FCS}$ ) 中で細胞に加え、プレートを $37^{\circ}\text{C}$ で3時間培養した。アラマーブルーからの蛍光を、励起波長 $544\text{ nm}$ 及び発光波長 $590\text{ nm}$ を用いて、蛍光マイクロプレートリーダー (モレキュラー ダイナミックス社製のFmax 蛍光マイクロプレートリーダー) で読んだ。

## 【0036】

第1組目の実験では、2つのCPA組成物、即ち $1\text{ M}$ のジメチルスルホキシド (DMSO) (図2において1、3 CHD及び図3において1、4 CHDの各濃度におけるグラフの左棒) あるいは最終濃度が $1\text{ M}$ のDMSO、ホルムアミドとプロパンジオールの組合わせ (図2において1、3 CHD及び図3において1、4 CHDの各濃度においてグラフの右棒) を用いた。濃度を1、3 CHDおよび1、4 CHDを0から $1\text{ M}$ に変えて、これら2つの別のCPA組成物に加えて更に実験を行った。細胞の活性を上記試験法によって評価した。

## 【0037】

結果を図2と3とにグラフで示した。図2は、1、3 CHDに関し、図3は1、4 CHDに関する。各々の場合、データを従来の凍結防止剤のみの場合に標準化し、12回繰り返してその平均値 ( $+/-$ ) とした。これら2つの図に示すように、CHD化合物を含まない (即ち、 $0.00\text{ CHD}$ 濃度) 従来の凍結防止剤

のみを含む比較例の凍結防止剤に比較して、活性が顕著に増大していた。

【0038】

(1) ラットの胸部大動脈から得た平滑筋細胞の確立した細胞系統であるA10及び(2) ウサギの頸静脈から得られた平滑筋の第1の細胞株であるJ15も含め、他の細胞タイプについても、AV5の場合の上記結果と同様の結果が得られた。

【0039】

実施例2

本実施例では、不凍性蛋白質(AFP)を凍結防止組成物に加えた。種々の濃度の3つの異なるAFP(AFP I, AFP I I I及びAFGP)を1MのDMSOと0.24Mの1,3CHD(図5)あるいは0.5Mの1,4CHD(図4)と一緒に使用した。再度、図1のプロトコールに従った。データを比較例である従来の凍結防止剤のみ(即ち、DMSOのみ)の場合に対して標準化し、結果を図4と図5とに示した。

【0040】

図4に、1,4CHD/AFP I/DMSOの組合わせを使用して凍結させた後のAV5の細胞の比較活性をまとめた。各種の濃度の成分には0.5Mの1,4CHDと、0.1mg/mLのAFP Iと1MのDMSOとを含んでいた。グラフには1MのDMSOのみの場合と1,4CHDあるいは上記濃度の1,4CHDとAFP Iを組み合わせた場合の活性を示す。データは従来の凍結防止剤(DMSO)のみの場合に対して標準化し、3回繰り返しその平均(+/-SEM)とした。

【0041】

図4において、得られた結果は、従来の凍結防止剤のみの場合と比較してCHD分子を加えた場合に細胞の活性が増加し、従来の凍結防止剤/CHDの混合物にAFP I蛋白質を添加した場合には更に活性の増加したことが立証された。このようにAFPとCHDの存在により累積的な効果が得られることが立証された。

【0042】

図5において、1、3 CHD、DMSOと3つの異なったAFP蛋白質を組合わせたものを使用して凍結させた後のAV5の細胞の比較活性をまとめた。各種の濃度の成分には0.25Mの1、3 CHDと、1MのDMSOと各AFP蛋白質は0.1mg/mLを含んでいた（グラフの左の棒がAFPIについてであり、グラフの中央の棒がAFPIIであり、グラフの右の棒がAFGPである）。データはDMSOのみの場合に対して標準化し、3回繰り返した平均（+/-SEM）とした。

【0043】

図5のデータから、従来の凍結防止剤のみあるいは従来の凍結防止剤/CHDの混合物の場合と比較して細胞の活性が上昇したことに見られるように、本実施例の細胞に対してAFPIが最良の保護を与えていると思われる。活性においてこのような累積的な上昇はAFPプラス中理の凍結防止剤のみの場合（即ちCHDがない場合）には見られない。

【0044】

本発明は、発明の特定の実施態様に関して述べたが、多くの置換、変更及び変性は当業者には自明であることは明らかである。従って、本明細書で述べる本発明の好ましい実施態様は単に例示的なもので、制限的なものではない。種々の変更は、特許請求の範囲に定義する発明の精神及び範囲に逸脱することなく行えるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本願で概説した結果を得る際に用いた低温保存工程を概説するフローチャートである。

【図2】 従来の凍結防止剤との関連でCHD化合物を使用した場合の凍結後の細胞の比較活性のプロットである。

【図3】 従来の凍結防止剤との関連でCHD化合物を使用した場合の凍結後の細胞の比較活性のプロットである。

【図4】 不凍性蛋白質との関連でCHD化合物を使用した場合の凍結後の細胞の比較活性のプロットである。

【図5】 不凍性蛋白質との関連でCHD化合物を使用した場合の凍結後の細胞



の比較活性のプロットである。

【 図 1 】

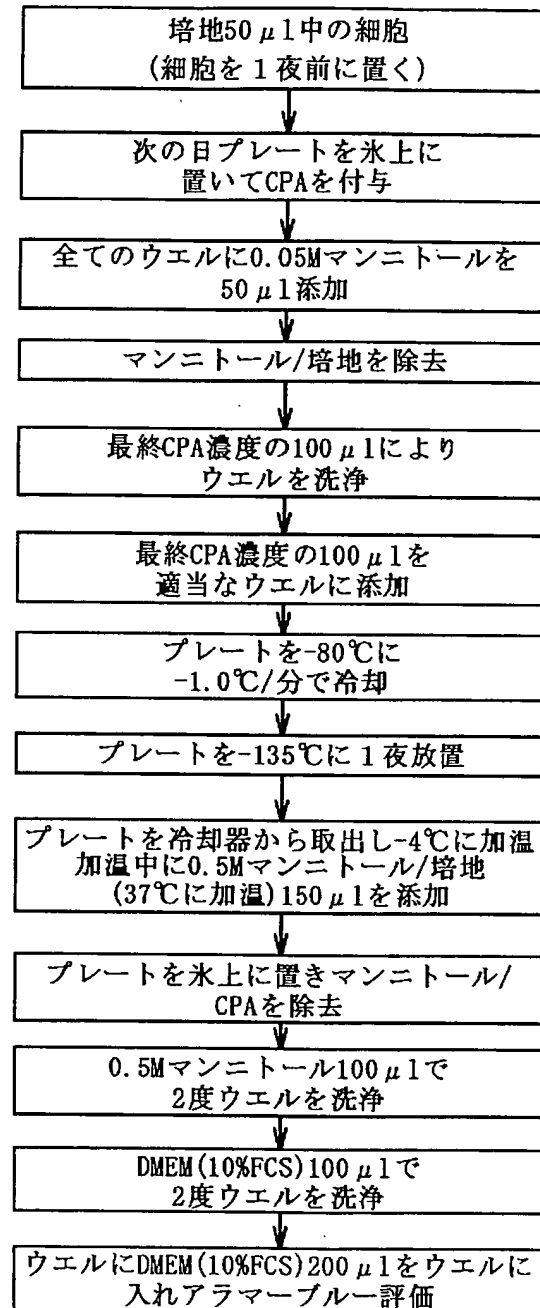


FIG. 1

【 図 2 】

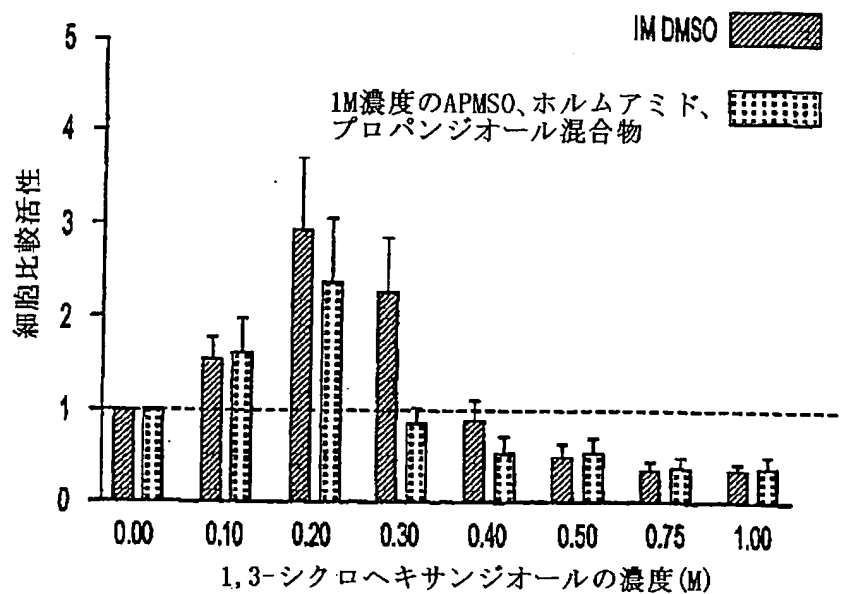


FIG. 2

【 図 3 】

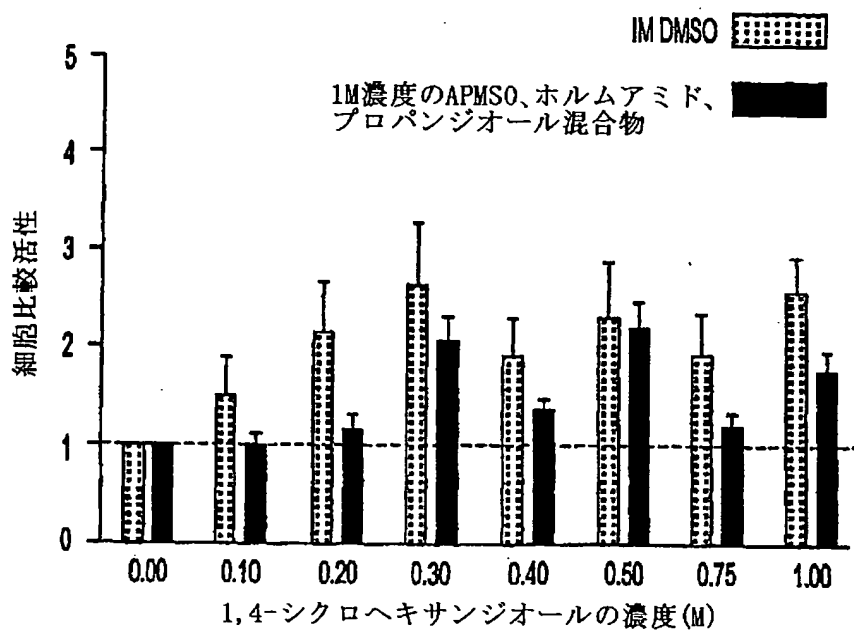


FIG. 3

【 図 4 】

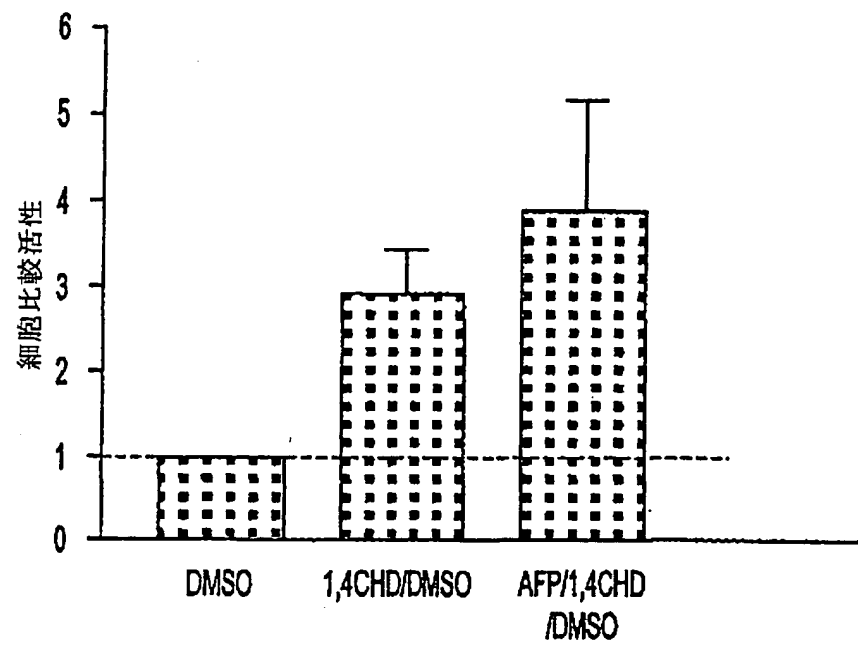


FIG. 4

【 図 5 】

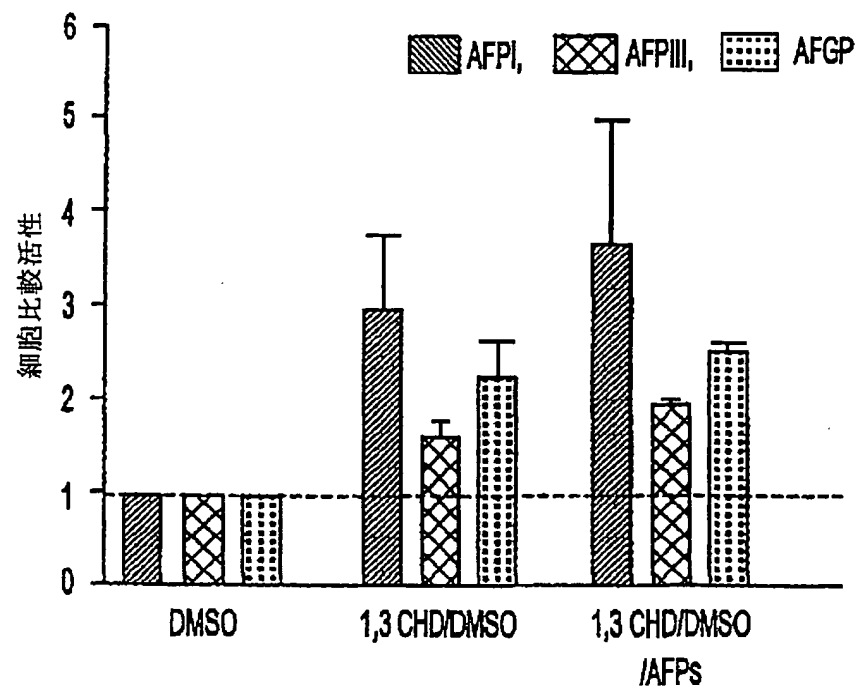


FIG. 5

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月1日(2002. 11. 1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】細胞を、1, 3-シクロヘキサンジオール及び1, 4-シクロヘキサンジオールのシス体あるいはトランス体及びそれらのラセミ体からなる群から選択される少なくとも一種のシクロヘキサンジオール化合物とアセタミド、アガロース、アルギナート、1-アナリン(analine)、アルブミン、酢酸アンモニウム、ブタンジオール、硫酸コンドロイチン、クロルホルム、塩化デキストラン(dextrans)、ジエチレングリコール、ジメチルアセタミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エリスリトール、エタノール、エチレングリコール、ホルムアミド、グルコース、グリセロール、 $\alpha$ -グリセロホスフェート、グリセロール、モノアセテート、グリシン、ヒドロキシエチルスターチ、イノシトール、ラクトース、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、マルトース、マンニトール、マンノース、メタノール、メチルアセトアミド、メチルホルムアミド、メチルウレア、フェノール、プルロニックポリオール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プロリン、プロピレングリコール、ピリジンN-オキシド、リボース、セリン、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、サッカロース、トレハロース、トリエチレングリコール、トリメチルアミンアセテート、尿素、バリン及びキシロースからなる群から選択される少なくとも1種類の別の低温保存化合物とを含む低温保存組成物と接触させた後、細胞の温度を低温保存温度にまで下げることからなる、細胞を低温保存する方法。

【請求項2】低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の不凍蛋白を含む、請求項1の方法。

【請求項3】低温保存組成物がさらに少なくとも1種類の不凍糖蛋白を含む、請求項1の方法。

【請求項4】冷凍保存温度が $-20^{\circ}\text{C}$ 以下である、請求項1乃至3のいずれかの方法。

【請求項5】少なくとも一種のシクロヘキサンジオール化合物と少なくとも一種の別の低温保存剤化合物とからなり、前記少なくとも一種のシクロヘキサンジオール化合物が1, 3-シクロヘキサンジオール及び1, 4-シクロヘキサンジオールのシス体あるいはトランス体及びそれらのラセミ体からなる群から選択され、前記少なくとも一種の別の低温保存剤化合物がアセタミド、アガロース、アルギナート、1-アナリン (aniline)、アルブミン、酢酸アンモニウム、ブタンジオール、硫酸コンドロイチン、クロルホルム、塩化デキストラン (dextrans)、ジエチレングリコール、ジメチルアセタミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキサイド (DMSO)、エリスリトール、エタノール、エチレングリコール、ホルムアミド、グルコース、グリセロール、 $\alpha$ -グリセロホスフェート、グリセロール、モノアセテート、グリシン、ヒドロキシエチルスターチ、イノシトール、ラクトース、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、マルトース、マンニトール、マンノース、メタノール、メチルアセトアミド、メチルホルムアミド、メチルウレア、フェノール、プルロニックポリオール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、プロリン、プロピレングリコール、ピリジンN-オキサイド、リボース、セリン、臭化ナトリウム、塩化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、ソルビトール、サッカロース、トレハロース、トリエチレングリコール、トリメチルアミンアセテート、尿素、バリン及びキシロースからなる群から選択される、低温保存組成物。

【請求項6】さらに少なくとも1種類の不凍蛋白を含む、請求項5の低温保存組成物。

【請求項7】さらに少なくとも1種類の不凍糖蛋白を含む、請求項5の低温保存組成物。

## 【 國際調查報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/12465

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A01N1/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18169 A (LIFE SCIENCE HOLDINGS INC ;ORGAN INC (US)) 15 April 1999 (1999-04-15) claims 2,18,19,21 page 18, paragraph 2 page 25, paragraph 3 - paragraph 4 page 27, paragraph 4 - paragraph 5	1-19
X	WO 00 16618 A (21ST CENTURY MEDICINE INC) 30 March 2000 (2000-03-30) page 29, line 5 claims 1,10-20 page 9, line 34-36	1-19
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "*" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 September 2001		Date of mailing of the international search report 25/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 6001 Fax. (+31-70) 240-3010		Authorized officer Decorde, D

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) (July 1997)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/12465

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.
X	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; O'CONNELL, KATHLEEN M. ET AL: "Cryoprotectants for Crithidia fasciculata stored at -20.deg.. Trypanosoma gambiense and T. conorhini" retrieved from STN Database accession no. 70:103995 XP002177168 abstract &amp; J. PROTOZOOL. (1968), 15(4), 719-24 ,</p>	1-19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/12465

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918169	A	15-04-1999	AU 9784298 A	27-04-1999
			EP 1019458 A	19-07-2000
WO 0016618	A	30-03-2000	AU 1093900 A	10-04-2000
			AU 6499299 A	10-04-2000
			EP 1115281 A	18-07-2001
			WO 0016619 A	30-03-2000



## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 マイケル ジェイ テイラー

アメリカ合衆国 サウスカロライナ州

29464 マウント プレザント チェルソ

ネス ラウンド 1217

(72)発明者 リア ハンソン キャンベル

アメリカ合衆国 サウスカロライナ州

29464 マウント プレザント ヒストリ

ック ドライヴ 100

Fターム(参考) 4B065 AA90X BD12 BD22 BD25

BD27 BD38 BD39

4H011 BB02 BB03 BB06 BB07 BB08

BB09 BB14 BB17 BB18 BB19

CA02 CB08 CD02 CD06 DF06

DH03 DH10 DH11